

Mise en évidence des voies de pénétration du *Phytophthora cactorum* (L. et C.) SCHROETER dans les pommes 'Golden delicious'.

Etude réalisée en microscopie électronique à balayage.

X. MOURICHON et G. BOMPEIX*

DEMONSTRATION OF ROUTES BY WHICH *PHYTOPHTHORA*
CACTORUM (L. and C.) SCHROETER PENETRATES
«GOLDEN DELICIOUS» APPLES
Experiment using scanning electron microscopy
X. MOURICHON and G. BOMPEIX

MISE EN EVIDENCE DES VOIES DE PENETRATION DU
PHYTOPHTHORA CACTORUM (L. ET C.). SCHROETER
DANS LES POMMES 'GOLDEN DELICIOUS'
Etude réalisée en microscopie électronique à balayage.

X. MOURICHON et G. BOMPEIX

Fruits, Dec. 1979, vol. 34, n° 12, p. 761-766

Experimental inoculations of «Golden delicious» apples with *Phytophthora cactorum* produced symptoms mainly localised in the median zone and the zone with the peduncle. The use of scanning electron microscopy and a lenticel permeability test enabled us to define the portals of entry : open lenticels and ruptured cuticles.

RESUME - Des inoculations expérimentales de pommes «Golden delicious», par le *Phytophthora cactorum* font apparaître des symptômes localisés préférentiellement dans les zones médianes et pédonculaires des fruits. L'utilisation de la microscopie électronique à balayage et d'un test de perméabilité lenticellaire permettent de préciser les voies de pénétration : lenticelles ouvertes et fractures cuticulaires.

Parmi les maladies des pommes causées par des champignons, celle due au *Phytophthora cactorum* (L. et C.) SCHROETER est certainement la moins étudiée tant sur le plan écologique que physio-pathologique. Nous avons, dans un précédent travail (BOMPEIX et MOURICHON, 1977), montré l'importance de cette maladie qui peut se déclarer certaines années, aussi bien au verger, lors des mois de septembre et octobre, que pendant la conservation, et même plusieurs mois après la récolte (figure 1).

La pénétration du *P. cactorum* a retenu tout spécialement notre attention, car cette espèce n'avait pu être classée dans un des groupes de parasites des Pomoïdées habituellement distingués (BONDOUX et al., 1969) à savoir les parasites de blessures, lenticellaires, oculaires ou pédonculaires.

La pénétration des *Phytophthora* spp. dans les organes végétaux peut se réaliser suivant des modalités très différentes.

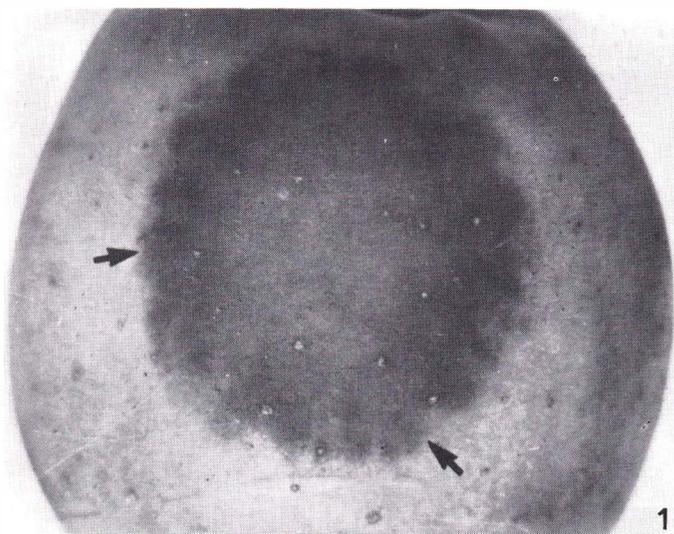


Figure 1. Début de symptômes sur le cv 'Golden delicious'. Les bords festonnés, et digités de la lésion (flèches) sont caractéristiques.

* - Université Paris VI - Pathologie végétale, T53,
4 place Jussieu - 75230 Paris Cedex 05.

Elle peut s'effectuer par des voies naturelles comme les stomates dans le cas du *P. syringae* parasite du *Foeniculum vulgare* (NOVIELLO et SNYDER, 1962). Elle peut également avoir lieu entre deux cellules épidermiques comme pour le *P. cinnamomi*, parasite des racines d'avocatier (ASSAS M'BILLAUT, 1978) et les *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* et *P. palmivora* provoquant la pourriture du coeur de l'ananas (BOHER, 1976). Parfois même, elle peut se réaliser au travers de la cuticule comme pour le *P. infestans* parasite de la pomme de terre (WOOD, 1967).

Les propagules infectieuses sont soit les sporocystes, soit des zoospores, plus rarement des oospores.

Dans le cas du *P. cactorum*, nous avons montré que les zoospores sont les propagules les plus efficaces pour la réussite de l'infection (MOURICHON, 1979). Cependant, les voies de pénétration du parasite dans les fruits n'étaient pas connues. En effet, lorsque les fruits sont inoculés expérimentalement par trempage dans les suspensions infectieuses et que les premiers symptômes apparaissent, deux cas peuvent se présenter : les taches semblent nettement centrées sur des lenticelles, ou alors se situent sur des zones cuticulaires qui en sont dépourvues (figure 6). A partir de ces observations nous avons tenté d'infecter les fruits en effectuant un très grand nombre d'inoculations ponctuelles sur des lenticelles ou sur des zones cuticulaires. Dans ces deux types d'essais, nous n'avons jamais réussi à obtenir d'infection. Seule une inoculation expérimentale par trempage s'est révélée efficace.

Deux hypothèses nous permettent d'expliquer les échecs successifs d'inoculations ponctuelles :

1. l'immersion des fruits dans la suspension infectieuse donne toute chance d'atteindre les quelques sites favorables de pénétration, ce que ne permet pas l'inoculation ponctuelle.
2. Des voies de pénétration non décelables à l'oeil nu, expliqueraient le développement des lésions sur des zones dépourvues de lenticelles.

MATERIEL ET TECHNIQUES

Obtention des inoculums.

Les conditions d'obtention des sporocystes du *P. cactorum* dépendent étroitement de la présence d'eau libre et de lumière. Leur formation se fait suivant des modalités proches de celles utilisées chez d'autres espèces de *Phytophthora*. Après un développement mycélien de quatre à cinq jours en boîtes de Pétri sur les milieux «Pois» ou «V8», des disques de mycélium frontal (10 mm de diamètre) sont prélevés à l'emporte-pièce puis déposés, - face portant le mycélium dirigée vers le haut - sur un film d'eau distillée stérile. Après 48 heures d'incubation à 20°C et à la lumière, de nombreux sporocystes sont observés autour des explantats ainsi qu'à leur surface. Pour obtenir les zoospores, les boîtes de Pétri sont placées durant une heure à 5°C. La concentration de zoospores libérées dans le milieu aqueux est maxima-

le une heure après leur retour à la température ambiante. En revanche, pour obtenir une suspension de sporocystes, il suffit de les séparer du mycélium par une agitation légère durant 15 mn. La suspension ainsi obtenue est utilisée directement ou après concentration sur filtre Millipore 8 µm (50.000 propagules/ml).

Mode d'inoculation.

Les fruits sont inoculés soit par trempage rapide dans l'une des suspensions infectieuses, soit par dépôts localisés à la micropipette. Immédiatement après l'inoculation, les fruits sont placés dans des enceintes balayées par un courant d'air à humidité voisine de la saturation à 22°C.

Techniques de microscopie électronique à balayage (MEB)

Des fragments de pomme sont prélevés 24 heures après le dépôt des sporocystes ou des zoospores. Les prélèvements peuvent être aussi effectués plus tard : par exemple, dès l'apparition des premiers symptômes (chaque échantillon comprenant alors l'ensemble de la tache d'infection). Après fixation par la glutaraldéhyde à 4 p. 100 dans le tampon cacodylate pendant une heure, les échantillons sont déshydratés dans quatre bains d'alcool de concentrations croissantes puis dans un mélange éthanol-acétone (vol./vol.) et enfin dans trois bains d'acétone pure. Ils sont ensuite déshydratés par la technique du point critique, puis métallisés par pulvérisation d'un mélange or-palladium qui se dépose sous la forme d'une fine couche métallique d'environ 200 Å d'épaisseur. Nos observations ont été réalisées à l'aide des microscopes électroniques à balayage «Cambridge Stereoscan 600» et «Cameca MEB 07».

RESULTATS

Comportement du parasite à la surface du fruit, avant la pénétration.

Sachant que les sporocystes d'une part, et que les zoospores d'autre part, sont capables d'infecter les fruits, nous avons cherché, immédiatement après leur inoculation, à étudier leur comportement à la surface de la cuticule, pendant la période précédant la pénétration. Les fruits inoculés au hasard par des dépôts ponctuels sont placés à 20°C, en humidité relative voisine de la saturation pendant 24 heures. Les zones inoculées sont ensuite prélevées et traitées pour l'observation en MEB.

Avec les sporocystes, nous observons à la surface de la cuticule une germination directe (figures 2, 3 et 4). Le mycélium qui en est issu, est adhérent à la cire cuticulaire (figure 5) et peut atteindre 300 µm de longueur. De plus cet examen met en évidence, sur certains échantillons, la présence de «fractures cuticulaires» (figure 2, f.c.).

Avec les zoospores, quelle que soit leur concentration, nous n'avons jamais retrouvé d'élément fongique à la surface de la cuticule. Ceci est sans doute dû à la faible longueur des tubes germinatifs issus des zoospores qui ne leur permet pas d'adhérer suffisamment pour résister aux traitements

préalables à l'étude en MEB.

Voies de pénétration du mycélium.

L'étude au MEB immédiatement après inoculation, ne permet pas l'observation, à coup sûr, des voies de pénétration. Pour mieux les situer nous attendons l'apparition des micro-taches en recherchant à leur surface des fragments mycéliens responsables de l'infection.

Dans le cas des taches centrées sur lenticelles (figure 7), nous retrouvons le parasite sur la cuticule et dans les espaces lenticellaires. Dans le cas de taches ne comprenant aucune lenticelle, les seuls sites où le mycélium est présent, sont les fractures cuticulaires observées précédemment et dans lesquelles pénètre le parasite (figures 8 et 9). Nous n'avons jamais observé de pénétration directe au travers de la cuticule.

Deux voies de pénétration sont donc mises en évidence : les lenticelles et les fractures cuticulaires.

Jusqu'à présent nous n'avons pas examiné si toutes les zones du fruit sont également réceptives à la maladie. Pour le vérifier, nous avons inoculé des fruits par trempage (cv. «Golden delicious») et étudié la répartition des taches qui apparaissent dans les trois zones suivantes (figure 10) : zone pédonculaire z.p., zone médiane z.m., zone oculaire z.o. Afin de déterminer le nombre et la répartition des lenticelles ouvertes dans ces trois zones sur un lot de dix fruits, nous avons utilisé un test de perméabilité lenticellaire (BOMPEIX, 1968), consistant à immerger un lot de pommes pendant six heures, à la température ambiante, dans une solution aqueuse de bleu de méthylène à 1 p. 1000. Les lenticelles entourées d'une auréole bleue résultant de la diffusion du colorant dans les tissus sous-jacents, sont considérées comme ouvertes. Le nombre de lenticelles ouvertes, ainsi que le nombre de lésions par fruit et par zone, sont indiquées dans le tableau 1.

Nous avons défini un rapport de pénétration lenticellaire (nombre de lésions par rapport au nombre de lenticelles ouvertes, par fruit et par zone). Des valeurs égales de ce rapport pour les trois zones, montreraient sans ambiguïté un mode de pénétration identique. Or, si ce rapport peut être considéré comme équivalent dans les zones médiane et pédonculaire, il n'en va pas de même dans la région oculaire où, compte-tenu du grand nombre de lenticelles ouvertes, il apparaît peu de lésions. Bien que leur nombre soit faible, leur répartition peut s'expliquer d'une part par la présence des fractures cuticulaires qui, après un test au bleu de méthylène suivi d'une étude au microscope, apparaissent essentiellement localisées dans les zones pédonculaires et médianes des fruits et, d'autre part par les variations du degré d'ouverture des lenticelles. Ces dernières sont en effet nettement plus ouvertes dans ces deux zones que dans la région oculaire (BOMPEIX, 1968).

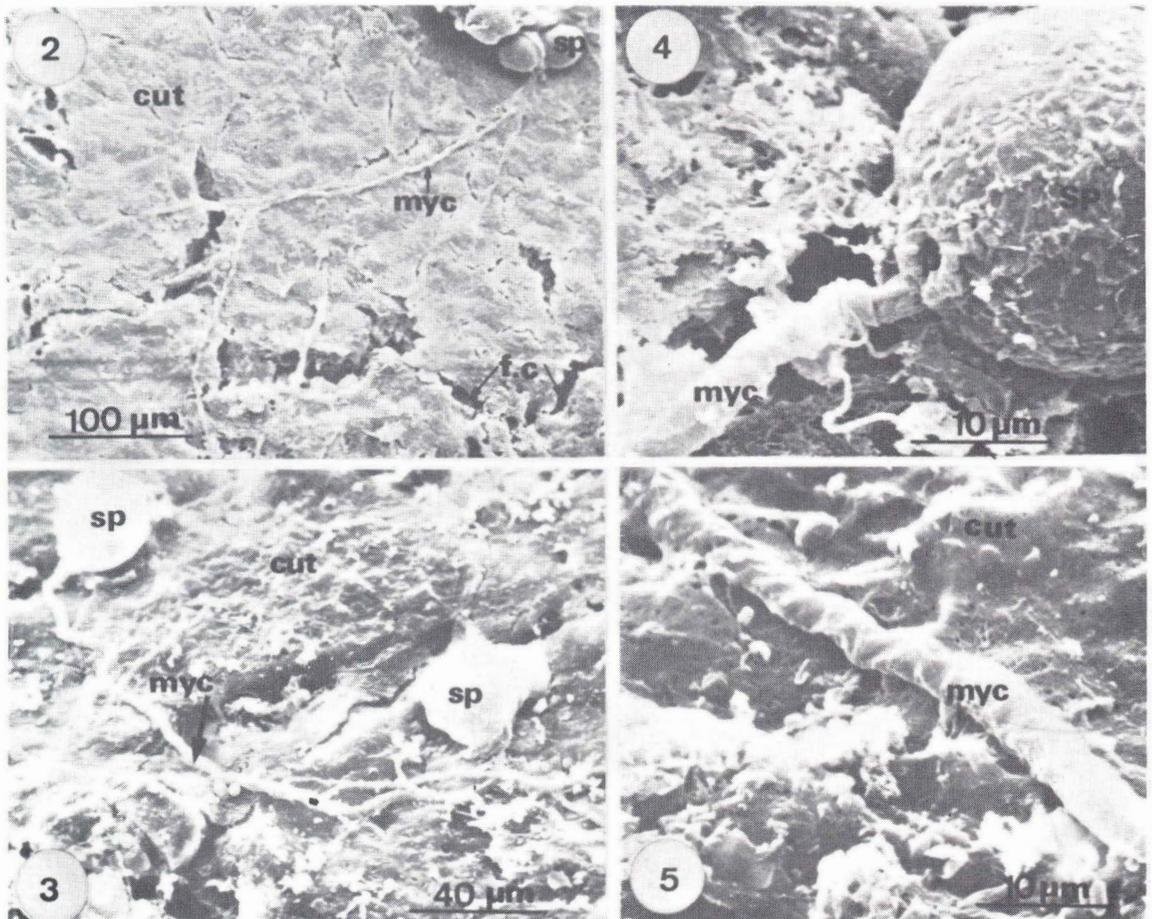
Notre étude met en évidence les deux modes de pénétration du *P. cactorum* dans les pommes :

- il pénètre par les lenticelles ouvertes, présentant un degré d'ouverture élevé, donc localisées préférentiellement dans les zones médianes et pédonculaires des fruits. A ce titre le *P. cactorum* peut se classer parmi les parasites lenticellaires au même titre que les *Pezizula* spp., sans toutefois présenter une phase de latence qui caractérise ces derniers (BOMPEIX, 1968 ; 1978).
- il pénètre également par les fractures cuticulaires mises en évidence en microscopie électronique à balayage. Ces fractures semblent en plus grand nombre dans les zones médianes et pédonculaires des pommes. Elles ne sont pas visibles à l'oeil nu, ce qui explique l'absence apparente de voies de pénétration et la présence de taches non centrées sur les lenticelles ou localisées sur des zones cuticulaires qui en sont dépourvues.

Nous remercions Madame MALFATTI (technicienne Université) pour sa participation à ce travail.

TABLEAU 1 - Répartition du nombre de lenticelles ouvertes sur dix fruits et du nombre de taches de pourriture sur quatre-vingt fruits après inoculation expérimentale, suivant les zones pédonculaire, Z.P., médiane, Z.M., et oculaire, Z.O., des pommes.

Zones	Nombre de lenticelles ouvertes/10 fruits	Nombre moyen de lenticelles ouvertes /fruit (b)	Nombre total de taches/80 fruits	Nombre moyen de taches/fruit (a)	Rapport de pénétration lenticellaire $\frac{a}{b} \times 100$
Z.P.	343	34,3 ± 15,25	18	0,225 ± 0,092	0,65
Z.M.	1870	187 ± 61,78	86	1,075 ± 0,232	0,57
Z.O.	624	62,4 ± 9,48	10	0,125 ± 0,077	0,20



Figures 2, 3, 4 et 5. ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE DE LA GERMINATION, «IN VIVO», DES SPOROCYSTES.

• Figures 2 et 3. Développement mycélien (my) à la surface de la cuticule (cut) à partir de la germination directe de deux sporocystes (sp). Noter la présence de fractures cuticulaires (f.c). Figure 2 : G x 250 - Figure 3 : G x 750.

• Figure 4. Détail d'un sporocyste, après germination directe. L'émission du tube germinatif a eu lieu à proximité de la papille (p). G x 2500.

• Figure 5. Détail du mycélium (myc) à la surface de la cuticule, au niveau de son apex. G x 2500.

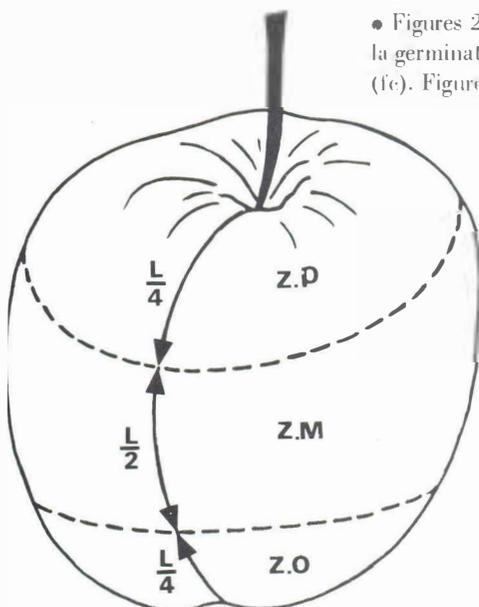


Figure 10. Répartition des zones pédonculaire (z.p.), médiane (z.m.) et oculaire (z.o.) suivant la distance oeil-pédicelle du fruit (L.).

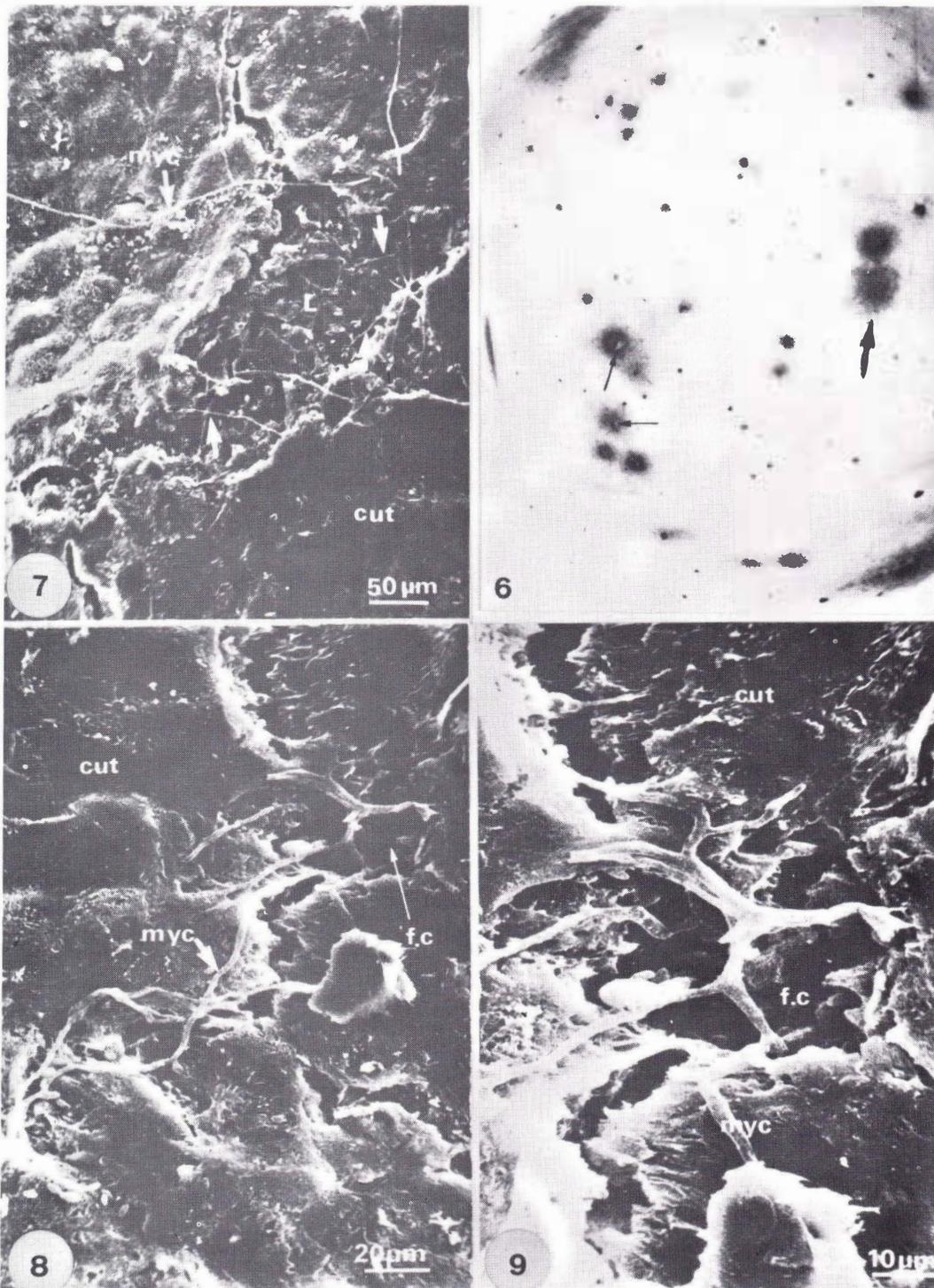


Figure 6. Petites taches d'infection apparaissant, soit nettement centrées sur des lenticelles (flèches fines), soit situées sur des zones cuticulaires qui en sont dépourvues (flèches épaisses).

Figures 7, 8 et 9. ETUDE DE LA PENETRATION EN MICROSCOPIE A BALAYAGE.

- Figure 7. Détail d'une lenticelle (L) au niveau de laquelle pénètre en plusieurs endroits, du mycélium (flèches). G x 180.
- Figure 8. Pénétration du mycélium au niveau d'une fracture cuticulaire (fc). G x 433
- Figure 9. Détail de la figure précédente. G x 870.

BIBLIOGRAPHIE

- ASSAS M'BILLAUT (G.). 1978.
La pourriture brune des racines d'avocats. Etude histologique de la pénétration et de l'infection des racines par le *Phytophthora cinnamomi* RANDS.
Fruits, 33 (2), 107-115.
- BOHER (B.). 1978.
La pourriture du coeur de l'ananas. Etude de l'infection par le *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* et le *Phytophthora palmivora* (BUTL.) BUTL.
Fruits, 36 (6), 365-371.
- BOMPEIX (G.). 1968.
Perméabilité lenticellaire des pommes et susceptibilité aux attaques fongiques.
Bull. Soc. Bot. Fr., 115, 75-81.
- BOMPEIX (G.). 1978.
Quelques aspects physiologiques des relations hôte-parasite durant la conservation des pommes.
Fruits, 33 (1), 22-33.
- BOMPEIX (G.) et MOURICHON (X.). 1977.
Phytophthora cactorum (L. et C.) SCHROET., *P. syringae* KLEB., *Phytophthora* spp. parasites des pommes et des poires.
C.R. Acad. Agric., 493-501.
- BONDOUX (P.), BOMPEIX (G.), MORGAT (F.) et VIARD (P.). 1969.
Les principales pourritures des pommes et des poires en conservation.
Centre Techn. Inf. Fruits et Légumes (CTIFL), Paris, 75 p.
- MOURICHON (X.). 1979.
Etude biologique et cytologique de la maladie des pommes (*Pirus malus*) causée par le *Phytophthora cactorum* (LEB. et COHN) SCHROETER.
Thèse Doct. 3ème cycle, Univ. Paris VI, 135 p.
- NOVIELLO (C.) et SNYDER (W.C.). 1962.
A *Phytophthora* disease of Fennel.
Phytopathol. Z., 46, 159-163.
- WOOD (R.K.S.). 1967.
Physiological Plant Pathology.
Oxford, Blackwell, 570 p.





E. E. AZOULAY & C°

tous les fruits
exotiques

2, rue des Tropiques
E 108-94538 RUNGIS Cedex
tél. 687 25 40 - télex : 270079